论著

文章编号:1000-5404(2013)03-0220-03

Osterix在调控脊柱发育中的作用

宗兆文[1],陈思旭[1],贾 敏[1],沈 岳[1],赵玉峰[1],郭庆山[1],华 翔[1],Jerry Feng[2] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤科,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[1];75246 美国 达拉斯,德克萨斯州卫生科学中心 Baylor 医学院[2])

[摘要] **目的** 观察核转录因子 Osterix 在脊柱发育中的作用。**方法** 采用 Lox P/Cre 系统,以 2.3 kb Ⅰ型胶原蛋白为启动子,在小鼠成骨细胞和骨细胞中特异性敲除 Osterix,观察 Osterix 敲除小鼠大体情况,采用 X 线摄片、HE 染色和 Nissl 染色观察其对小鼠脊柱发育的影响。**结果** Osterix 敲除小鼠后肢瘫痪,行走时前肢运动正常,拖动后肢爬行,Osterix 的敲除效率约为 75%;X 线片结果显示,Osterix 敲除小鼠形体变小,胸腰段脊柱出现楔形椎体、严重的脊柱侧弯和椎管狭窄等畸形;HE 染色结果显示胸腰段脊椎结构发育严重异常;Nissl 染色结果显示,受累节段脊髓神经元结构严重受损。**结论** Osterix 在脊柱发育中起到重要作用,敲除后可导致脊柱侧弯等畸形。

[关键词] Osterix;脊柱;发育;基因敲除
[中图法分类号] R336;R394.1;R682.3 [文献标志码] A

Role of Osterix in development of spine in mice

Zong Zhaowen[1], Chen Sixu[1], Jia Min[1], Shen Yue[1], Zhao Yufeng[1], Guo Qingshan[1], Hua Xiang[1], Jerry Feng[2] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burs and Combined Injury, Department of Trauma, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China; [2]Medical College of Baylor, Health and Science Center of Texas, USA)

[**Abstract**] Objective To investigate the role of Osterix in spine development. Methods Osterix was knocked out by crossing 2.3 kb Collagen I Cre mice with Osterix Lox P +/+ mice. X-ray radiology, HE staining and Nissl staining were employed to observe the effect of Osterix knockout on spine development. Results Osterix knockout mice demonstrated short stature, wedged vertebrae, severe scoliosis and spinal stenosis at the thoracic and lumbar regions of spine. HE staining showed that the structure of growth plate, vertebral body and spinal canal were totally disorganized. Nissl staining revealed that the neurons in the spinal cord at the inflicted region were strikingly damaged. Conclusion Osterix plays an important role in spine development, and Osterix knockout leads to severe spinal deformities such as scoliosis.

[**Key words**] Osterix; spine; development; knockout

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271935), the Key Project of the "Twelfth Five-year Plan" of Scientific Research of China (AWS11J008) and the Autonomous Foundation of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined injury (SKLZZ201124). Corresponding author: Zong Zhaowen, E-mail: zongzhaowen@163.com

Osterix是新近发现的一种核转录因子,在骨发育、生长过程中起重要作用。研究发现,胚胎期敲除Osterix导致小鼠完全没有骨性成分形成,出生后敲除Osterix后小鼠的成骨细胞成熟和向骨细胞分化严重受阻[1-3],提示Osterix无论在胚胎期还是出生后的骨发育和骨成熟中都起重要作用。脊椎的发育和生长是软骨化骨的过程,因而我们推测Osterix在脊柱发育可能会起重要作用。本研究采用Lox P/Cre系统敲除小鼠Osterix,然后采用X线摄片、HE染色和Nissl染色观察Osterix在脊柱发育中的作用,旨在观察脊柱发育的关键调控因素,并初步探讨脊柱侧弯等畸形的发生、发展机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和基因型鉴定

Osterix Lox P +/+小鼠、2.3 kb Collagen Ⅰ Cre小鼠和野生型小鼠由美国德克萨斯州卫生科学中心Baylor医学院的Jerry Feng教授馈赠。常规方法敲除Osterix时,多数小鼠死于胚胎期[1-3]。因而我们采用成年雄性Osterix Lox P +/+小鼠(体质量约40 g)和成年雌性2.3 kb Collagen Ⅰ Cre小鼠(体质

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271935);"十二五"科研项目重大项目分课题(AWS11J008);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室自主课题(SKLZZ201124)
[通信作者] 宗兆文,E-mail:zongzhaowen@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121129.1158.005.html(2012-11-29)



A：6周野生型小鼠（左）和Osterix敲除小鼠（右）；B：12周野生型小鼠（左）和Osterix敲除小鼠（右）；C：6周野生型小鼠（左）和Osterix敲除小鼠（右）脊柱

图1　野生型小鼠和Osterix敲除小鼠整体和脊柱发育X线片表现

量约40 g）杂交以获得Osterix Lox P+/+；2.3 kb Collagen Ⅰ Cre小鼠进而敲除Osterix。常规PCR进行基因型鉴定，简述如下：取新生9 d小鼠适量尾巴，常规方法提取基因组DNA，然后取1 μg DNA采用常规PCR进行基因型鉴定。鉴定Osterix Lox P+/+使用的引物为上游：5′-CTTGGGAACACTGAAGCTGT-3′，下游：5′-CTGTCTTCACCTCAATTCTATT-3′，引物长度390 bp；鉴定Cre使用的引物为上游：5′-CCCGCAGAACCTGAAGATG-3′，下游：5′-GACCCGGCAAAACAGGTAG-3′，引物长度300 bp。

1.2　检测指标

1.2.1　X线摄片检查　出生后6周和12周时，戊巴比妥钠充分麻醉Osterix敲除小鼠和野生型小鼠各4只，拍摄小鼠整体X线片。然后过量麻醉致死小鼠，取整段脊柱，取约100 mg椎体组织用于提取RNA，其他剩余组织用4%多聚甲醛4 ℃过夜固定，次日仔细去除脊柱周围软组织，拍摄脊柱X线片。

1.2.2　组织学处理　上述标本10% EDTA脱钙后，取畸形处胸12至腰1脊椎制备石蜡切片。矢状面和冠状面5 μm切片和10 μm切片，常规脱蜡和梯度酒精水化切片备用。

1.2.3　HE染色　5 μm组织切片常规进行HE染色。方法简述如下：取1.2.2中准备好的切片用苏木精液染色5 min，自来水冲洗1～3 s后1%盐酸乙醇分色1～3 s。蒸馏水漂洗1～2 s后0.5%伊红液染色1 min，蒸馏水漂洗1～2 s后梯度酒精脱水、二甲苯透明后中性树胶封固切片。

1.2.4　Nissl染色　10 μm横截面组织切片进行Nissl染色，方法简述如下：取1.2.2中准备好的切片用1%焦油紫染色10 min后蒸馏水冲洗，70%乙醇、95%乙醇和100%乙醇各1 min梯度脱水后置于100%氯仿5 s，1%盐酸乙醇分色1～3 s后梯度酒精脱水、二甲苯透明后中性树胶封固切片。

2　结果

2.1　Osterix敲除导致严重的脊柱发育畸形

新生Osterix敲除小鼠死亡率约为9%，绝大部分小鼠存活。Osterix敲除小鼠后肢瘫痪，行走时前肢运动正常，拖动后肢爬行，Osterix的敲除效率约为75%。X线片显示出生后6周和12周，Osterix敲除小鼠形体较野生型小鼠小，长骨明显短于野生型小鼠，肋骨和胸廓发育不良（图1）。胸腰段脊柱出现楔形椎体，椎体旋转形成侧弯畸形，以胸腰段为主，发生率为100%。测量结果显示，6周和12周小鼠脊柱侧弯的Kobb角分别约为55°和60°，轻度进展。HE染色结果显示，6周野生型小鼠椎体发育过程中，生长板结构正常，静止层、增生层、肥大层小排列良好，而在Osterix敲除小鼠中，生长板和椎体结构完全紊乱，基本无正常结构形成（图2）。

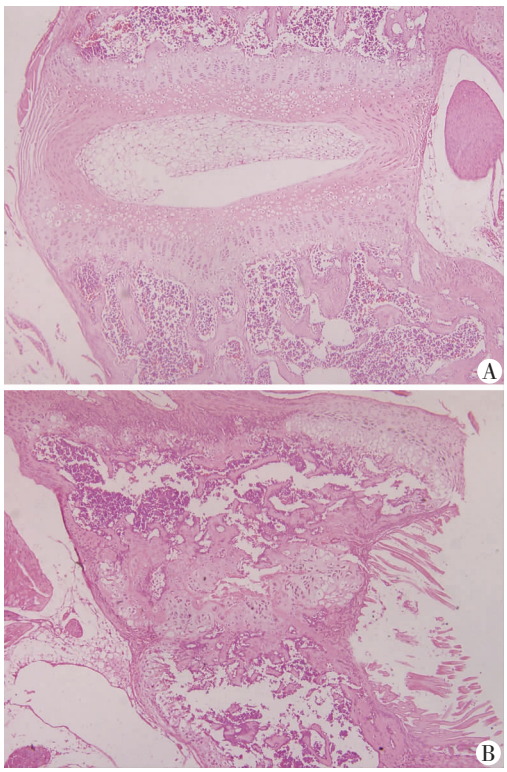
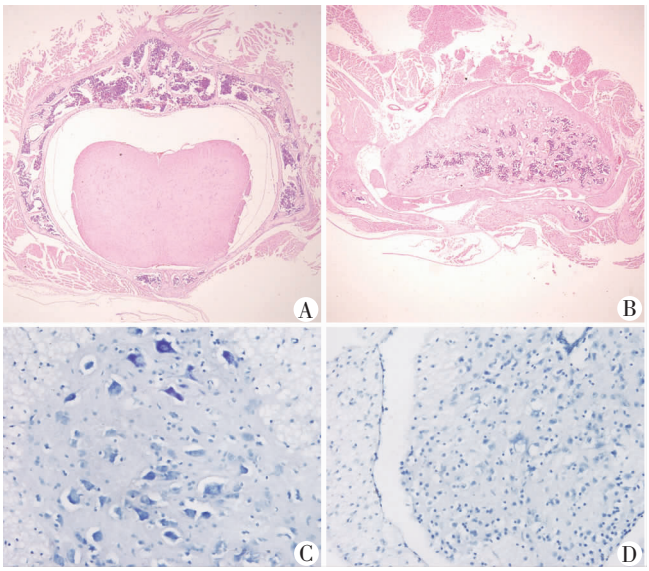


图2　6周野生型小鼠（A）和Osterix敲除小鼠（B）脊椎HE染色观察　（×100）

2.2　Osterix敲除形成严重的椎管狭窄和脊髓损伤

横截面HE染色结果显示，Osterix敲除小鼠的椎管发育受到严重影响，出现严重的椎管畸形，脊髓受压变形（图3A、B）。Nissl染色显示受压脊髓中神经元形体变形，Nissl小体溶解（图3C、D）。



A:6周野生型小鼠脊椎横截面HE染色(×40);B:6周Osterix敲除小鼠脊椎横截面HE染色(×40);C:6周野生型小鼠脊髓横截面Nissl染色(×100);D:6周Osterix敲除小鼠脊髓横截面Nissl染色(×100)

图3 野生型小鼠和Osterix敲除小鼠脊椎及脊髓横截面HE、Nissl染色观察

3 讨论

先天性脊柱侧弯和特发性脊柱侧弯等脊柱畸形在青少年中发病率较高,受累患者出现严重的外观畸形,严重者出现神经损伤的症状,给家庭和社会带来严重的精神和经济负担。但目前其致病机制尚不清楚,给其早期诊断和早期防治带来一定的困难。一般认为,其发病是多因素的,遗传、基因、环境、神经、肌肉和后天姿势等被认为在脊柱侧弯的发病机制中起到一定作用[4-6]。新近临床观察发现,双胞胎同时发生脊柱侧弯的概率约为75%,提示基因因素在先天性脊柱侧弯和特发性脊柱侧弯的发病中起到一定作用[7-8]。研究认为,在脊柱的发育过程中,骨形态发生蛋白、碱性成纤维因子、Hedgehog和Nothch等信号通路起着重要作用[9]。但目前尚少见证据表明这些信号通路的障碍可直接导致脊柱侧弯的发生。

Osterix是新近发现的一种核转录因子,被证实在骨发育中起关键的作用[1-3]。本研究中,我们以2.3 kb Ⅰ型胶原蛋白为启动子实现对Osterix的时间和位置特异性敲除,即从胚胎14.5 d在成骨细胞和骨细胞中特异性地敲除Osterix。X线片和组织学检测显示Osterix敲除导致的脊柱发育受阻,椎体高度明显小于野生型小鼠。同时,Osterix敲除小鼠出现脊柱侧弯畸形。提示单纯从成骨细胞和骨细胞中敲除Osterix便可形成脊柱侧弯畸形。目前研究脊柱侧弯的动物模型多涉及手术造成脊柱肌力不平衡形成脊柱侧弯[10-12]。而本研究发现敲除Osterix便可形成脊柱侧弯,其好发部位在胸腰段,与人类脊柱侧弯的好发部位一致,因而可作为研究脊柱侧弯1个良好的动物模型。

综上所述,本研究表明Osterix在脊柱发育中起到重要作用,Osterix敲除后可导致严重的脊柱畸形,并可能导致严重的脊髓损伤,但Osterix敲除导致上述畸形的发生机制和参与的信号通路尚不清楚。我们将进一步对这些问题进行深入研究。

参考文献:

[1] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, *et al*. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. Cell, 2002, 108(1): 17-29.

[2] Baek W Y, de-Crombrugghe B, Kim J E. Postnatally induced inactivation of Osterix in osteoblasts results in the reduction of bone formation and maintenance[J]. Bone, 2010, 46(4): 920-928.

[3] Zhou X, Zhang Z, Feng J Q, *et al*. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(29): 12919-12924.

[4] Elbakry M, Taheri M, Bouhanik S, *et al*. Identification of key disease-modifying factors in adolescent idiopathic scoliosis[J]. Stud Health Technol Inform, 2012(176): 449.

[5] 贾全章,许建中,周强,等. 胸廓成型术在特发性重度僵硬性脊柱侧弯矫治中的应用价值[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(24): 2364-2366.

[6] 秦勇,蔡金华,王忠良. 俯卧位CT扫描及椎弓根参数测量改良提高青少年特发性脊柱侧弯置钉定位的精准性[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(11): 1191-1194.

[7] Giampietro P F, Blank R D, Raggio C L, *et al*. Congenital and idiopathic scoliosis: clinical and genetic aspects[J]. Clin Med Res, 2003, 1(2): 125-136.

[8] Sparrow D B, Chapman G, Smith A J, *et al*. A mechanism for gene-environment interaction in the etiology of congenital scoliosis[J]. Cell, 2012, 149(2): 295-306.

[9] Tyl R W, Chernoff N, Rogers J M. Altered axial skeletal development[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2007, 80(6): 451-472.

[10] Janssen M M, de-Wilde R F, Kouwenhoven J W, *et al*. Experimental animal models in scoliosis research: a review of the literature[J]. Spine J, 2011, 11(4): 347-358.

[11] Farley F A, Hall J, Goldstein S A. Characteristics of congenital scoliosis in a mouse model[J]. J Pediatr Orthop, 2006, 26(3): 341-346.

[12] Farley F A, Loder R T, Nolan B T, *et al*. Mouse model for thoracic congenital scoliosis[J]. J Pediatr Orthop, 2001, 21(4): 537-540.

(**收稿**:2012-09-10;**修回**:2012-10-30)

(编辑 龙 亮)